

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2007 ~ 2009
 課題番号： 19790622
 研究課題名 (和文) 日本人多発性硬化症に対するインターフェロン治療の
 免疫学的評価と有効性の予測
 研究課題名 (英文) Immunological evaluation and prediction of the effectiveness of
 interferon therapy for the Japanese multiple sclerosis patients
 研究代表者 蕨 陽子 (柴崎陽子) (WARABI YOKO)
 財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員
 研究者番号：30399464

研究成果の概要 (和文)：

(1) 二次性進行型多発性硬化症では調節性 T 細胞が正常に働き、T 細胞の病的なクローン増殖が抑制されているが、視神経脊髄炎では逆の現象が起こっているため、日本人多発性硬化症は病気のタイプにより有効な治療法が異なる。

(2) 日本人多発性硬化症に対するインターフェロン療法の早期導入は、再発や病変の増加を抑制し、患者の生活の質の維持にも役立つ可能性がある。

(3) 二次性進行型の視神経脊髄炎の病態は軸索変性ではなく、炎症や脱髄の持続なので、インターフェロン療法を行わない方がよい。

研究成果の概要 (英文)：

(1) Secondary progressive multiple sclerosis (SPMS) had a normal function of the regulatory T cells, therefore SPMS had a small number of clonally expanded pathogenic T cells. Neuromyelitis optica expressed results exactly the opposite of SPMS. Japanese multiple sclerosis patients must choose the appropriate therapy according to their classified type.

(2) Early interferon therapy for the Japanese multiple sclerosis patients suppresses the number of relapse and the MRI lesions. Moreover, it effect to sustain the quality of life for the patients.

(3) Because the secondary progressive neuromyelitis optica patients reveal the inflammation and demyelination, they must not be treated with interferon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	68,235	0	68,235
2008年度	1,631,765	489,529	2,121,294
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	969,529	4,269,529

研究分野：生物系・医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：多発性硬化症、インターフェロン、視神経脊髄炎、神経科学、免疫学、脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) は中枢神経系の脱髄疾患であり、いまだ原因不明で治療法のない難病に含まれる。MSの再発を予防する薬として日本国内で唯一承認されているインターフェロンβは、発売前の治験の結果が報告され、日本人においてもその有効性が有意差をもって証明された [Saida, Neurology 2005]。しかし、欧米で広く治療に用いられてきたインターフェロンを、我々の診療している数多くの日本人MS患者に処方しても、有効でないばかりか、むしろ悪化する患者や重大な副作用に悩む患者がいることが確認できた [Warabi Y, J Neurol Sci, 252: 57-61, 2007]。

その原因として、日本人のMSは欧米人に比して、その病型や進行モード、遺伝的素因に明らかな違いがあることが挙げられる。MSの病型は古典型MS (CMS) と視神経脊髄型MS (OSMS) の二つに大きく分けられ、歴史的に日本人にはOSMSが多いと言われてきた。しかし本研究開始時点では、OSMSはDevic病またはneuromyelitis optica (NMO) との異同を含めて、MSであるか否かという根本的な議論にも決着を見ていなかった。さらに、そもそもCMSとOSMSをどのように分類するのか、その方法も確立されていなかった。この問題は日本のみならず世界的にも注目され、NMOの疾患マーカーとしてNMO-IgGが発見され、それがアクアポリン4 (AQP4) に対する抗体であるという報告がなされた [Lennon VA, Lancet 2004; Lennon VA, J Exp Med 2005]。欧米に比してNMO患者が多い本邦は、この研究分野での大きなアドバンテージを有している一方で、これらのように欧米から報告される治療効果や病型分類を、日本人の立場から検証する必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、日本人MS患者に対するインターフェロン治療の効果を免疫学的に評価し、欧米人に対してのみならず日本人MS患者に対しても、さらに有益な予防効果を発揮させることである。その前提としては、日本人MS患者の中に混在しているいくつかの病型を確実に分類し、インターフェロン治療が有効な群と有効でない群とを、治療開始前

に明確にすることである。特に、欧米人MSと全く同じ疾患であると言える典型的なMS患者、MSと区別されるべきNMO患者、それらの中間型などを区別する。それにより、欧米と同じ薬を日本人MS患者に処方することが、有効で安全であるのかどうかを検証する。その上で、どのような患者に対しては、欧米で証明されたと同様の予防効果を得られ、反対にどのような患者には投与しない方がよいのか、有効性を未然に予測してインフォームド・コンセントを行えるような情報を提供する。

3. 研究の方法

(1) ①22名のMS患者に説明と同意の上で採血を行い、末梢血リンパ球 (PBL) を採取し、real-time PCR法でFoxP3産生能を定量した。

②追加実験として、Auto MACSを用いてPBLからCD4+CD25+T細胞分画を分離してFoxP3産生能を定量した。

(2) 末梢血T細胞の病的なクローン増殖の解析をT細胞レセプター・レパトア分析の手法を用いて、13名の患者検体で追加実験した。

(3) インターフェロン未使用のMS患者とNMO患者6名ずつを対象とし、再発時や寛解時に血液を採取し、血液中の細胞成分の遺伝子解析をGenePlexアッセイで、血清成分の免疫学的検討をサイトカインのBioPlexアッセイにて行った。

4. 研究成果

(1) ①日本人MS患者の病型を確実に分類するための研究として、22名のMS患者の末梢血リンパ球 (PBL) を採取し、real-time PCR法でFoxP3産生能を定量した。その結果、二次性進行型MS (SPMS) は健常対照と同程度にFoxP3産生能が高く、再発寛解型MS (RRMS)、視神経脊髄型MS (OSMS) の順に低い結果となった。このことは、これまでに我々が報告した末梢血T細胞の病的なクローン増殖の程度 [Warabi Y, J Neurol Sci, 249: 145-152, 2006] と逆相関の関係を示していた。このこ

とから、SPMS の末梢血では調節性 T 細胞が正常に近い働きをしているために、T 細胞の病的なクローン増殖が抑制され、OSMS では逆の病態を呈している可能性が示唆され、日本人 MS は病型により有効な免疫学的治療法が異なることが予測された。

②この成果を日本神経免疫学会で発表し、討論を参考に追加実験を行った。第一に、Auto MACS を用いて PBL から CD4+CD25+T 細胞分画を分離して FoxP3 産生能を定量した。その結果、CD4+CD25+T 細胞分画の FoxP3 産生能は、PBL に比して約 10 倍であり、一方 CD4+CD25-T 細胞の産生能は約 1/100 であることが、再現性を持って示されたため、PBL の解析で CD4+CD25+T 細胞の FoxP3 産生能を代替できると結論した。

③第二に、FoxP3 産生能と逆相関があった末梢血 T 細胞の病的なクローン増殖の解析を、13 名の患者検体で追加実験し、さらに有意な結果を得た。

(2) 抗 AQP4 抗体の新たな検出方法の開発を試み、pIRES2-EGFP ベクターにヒト AQP4 全長配列を組み込み、それを CHO 細胞にトランスフェクションし、安定株を確立した。今後は FACS で定量する方法を確立し、患者血清での測定に入る予定である。

(3) 日本人患者に対するインターフェロン治療の効果をさらに高める目的で、臨床的な発作が 1 回以下だが MS が強く疑われる患者 5 名に IFNB-1b 療法を導入し(導入時平均年齢 30 才)、臨床経過について後ろ向き研究を行った。その結果、平均 3.9 年間の経過観察中、全例で明らかな再発はなく、5 名中 4 名は MRI での病変増加もなかった。さらに 5 名中 3 名が IFNB-1b 導入後に結婚した。よって、欧米からの報告と同様に日本人においても、MS の発病早期から IFNB-1b 療法を導入することで、再発や病変の増加を抑制し、患者の生活の質(Quality of life)の維持にも役立つ可能性が示唆された。ただし、5 例中 4 例の初診理由が脳幹脊髄病変であったため、日本人に多い視神経脊髄炎(neuromyelitis optica, NMO)との鑑別を慎重に行う必要があった。なぜなら、我々がこれまでに研究報告してきたように、NMO 患者に IFNB-1b 療法を行うと病状の悪化や強い副作用が出現する恐れがあるからである。よって、日本人 MS 患者に IFNB-1b 早期導入を行って治療効果を適切に発揮させるためには、NMO 患者を除外し、欧米型 MS へ進展する患者のみを適切に抽出することが最も重要であり、欧米の診断基準に加えて、

日本独自の IFNB-1b 導入基準を検討する必要があると考えた。

(4) IFNB-1b 治療を日本人患者に有効に行うためには、MS と neuromyelitis optica (NMO)の鑑別診断を確実に行って、MS 患者のみに IFNB-1b を用いることが重要であるが、鑑別困難な患者もいる。我々は NMO でありながら二次性進行型 MS に類似した進行性大脳萎縮を呈した症例について髄液検査所見を中心に検討した結果、二次性進行型 MS の進行は軸索変性によっておこるが、二次性進行型 MS に類似した NMO の進行は軸索変性とは機序が異なり、炎症や脱髄の持続によって起こっていることを明らかにした。このことから、二次性進行型 MS に対しては IFNB-1b 療法が行われるが、進行型の NMO に対しては再発寛解型の NMO と同様に IFNB-1b 療法を行わない方がよいことがわかった。

(5) MS と NMO のどのような免疫学的特徴の違いが、インターフェロンの効果の違いに結びついているのかを調べるため、インターフェロン未使用の MS 患者と NMO 患者 6 名ずつを対象とし、再発時や寛解時に血液を採取し、血液中の細胞成分の遺伝子解析を GenePlex アッセイで、血清成分の免疫学的検討をサイトカインの BioPlex アッセイにて行った。解析結果については、さらに症例数を増やして次年度以降に発表する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

①Yoko Warabi, Role of IL-1 and potential therapies in multiple sclerosis, Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies, 査読有、Vol. 4, No. 1, 2007, pp. 19-24

〔学会発表〕(計 5 件)

①蕨陽子、松原四郎、高橋利幸、視神経脊髄炎における二次性進行型多発性硬化症に類似した大脳萎縮の病態の検討、第 22 回日本神経免疫学会学術集会、2010 年 3 月 18 日、日経ホール(東京都)

②蕨陽子、沖山亮一、松原四郎、多発性硬化症が強く疑われる患者に対するインターフェロン療法早期導入の意義、第 50 回日本神経学会総会、2009 年 5 月 22 日、仙台国際セ

ンター（宮城県）

③蕨陽子、松原四郎、多発性硬化症確定診断前のインターフェロン療法早期導入の意義、第 21 回日本神経免疫学会学術集会、2009 年 3 月 13 日、大阪国際会議場（大阪府）

④ 蕨陽子、松本陽、林秀明、重度の視神経炎と脊髄炎を伴う多発性硬化症に対するインターフェロン療法の検討、第 48 回日本神経学会総会、2007 年 5 月 17 日、名古屋国際会議場（愛知県）

⑤蕨陽子、林秀明、松本陽、多発性硬化症の Foxp3 遺伝子発現の病型による比較解析、第 19 回日本神経免疫学会学術集会、2007 年 4 月 12 日、金沢市文化ホール（石川県）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蕨 陽子（柴崎陽子）（WARABI YOKO）

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員

研究者番号：30399464

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし